

Reagent PUUMALA IgM EIA	Mode d'emploi	 R E A G E N A	Fabricant : Reagent International Oy Ltd Takojantie 18, 70900 Toivala, FINLANDE www.reagent.fi, info@reagent.fi	
REF 114201	Version 1.7 FRE			

Reagent PUUMALA IgM EIA

Reagent PUUMALA IgM EIA est une épreuve immunoenzymatique de détection d'une infection aiguë au virus Puumala dans le sérum humain. Reagent PUUMALA IgM EIA est exclusivement destiné à l'usage professionnel.

Le virus Puumala, qui appartient à la famille des hantavirus, se trouve dans la plupart des pays européens. Ce virus est un agent responsable de la néphropathie épidémique (NE) et se transmet aux humains par inhalation ou contact direct avec les excréments du campagnol. La NE n'est que rarement fatale chez les individus en bonne santé mais elle peut entraîner une hospitalisation de longue durée. Le taux de mortalité de la NE est de 0,1- 0,3 % parmi les patients infectés. Une infection crée une immunité à vie contre la NE.

PRINCIPE DU TEST

Les anticorps IgM Puumala présents dans l'échantillon sont capturés par les anticorps spécifiques de la chaîne μ sur la plaque de microtitration. Les anticorps IgM du virus Puumala capturés sont détectés par l'enzyme PR (peroxydase de raifort) couplée à la protéine recombinante de la nucléocapside du virus Puumala. Le développement de la coloration est ensuite assuré par le substrat TMB. Le temps d'incubation total est de 2 heures et demie et le kit permet d'effectuer 40 analyses en double.

CONTENU DU KIT

1 cadre EIA	Contrôle, positif
3x4 bâtonnets diagnostiques (8-barrettes de microtitration)	Conjugué HRP
Tampon de concentré de lavage x 2	Substrat TMB
Tampon pour dilution	Solution d'arrêt
Contrôle, négatif	Mode d'emploi

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON INCLUS DANS LE KIT

Pipettes de précision et embouts de pipette, 5-100 μ l	Ruban d'étanchéité EIA
Pipette ou dispositif de lavage de la plaque 250 μ l / microcupule	Lecteur de microplaque EIA à longueur d'onde de 450 nm
Tubes d'échantillonnage 1 - 5 ml	Agitateur de plaque à microcupules
Une fiole de 0,5 ou 1 L	

CONSERVATION

Conserver le kit entre +4 et +8°C. Le kit reste stable jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Voir le tableau page 2 pour les informations concernant la conservation et la stabilité du kit.

ÉCHANTILLONS

Il est conseillé d'utiliser des échantillons frais (plutôt que congelés). Les échantillons congelés peuvent entraîner des faux positifs lorsque les résultats sont agrégés. Si l'échantillon est agrégé ou de mauvaise qualité, veuillez centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 3000 x g avant de les utiliser.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

- Ne pas mélanger de composants issus de lots différents.
- Ne pas utiliser de bâtonnets diagnostiques si l'emballage en aluminium qui les contient est endommagé.
- Ne pas mélanger les échantillons à tester puisque différentes matrices pourraient entraîner une mauvaise reproductibilité.

- Toute infection bactérienne ou fongique des tampons ou réactifs pourra entraîner des résultats erronés. Jeter tout réactif qui aurait l'air trouble lorsque vous l'inspectez à la lumière.

AVERTISSEMENT

- Les contrôles comprennent du sérum humain testé et trouvé négatif en VIH, HTLV, hépatite B et C. Veuillez manipuler les contrôles comme des substances potentiellement infectantes.
- Jetez les contrôles, échantillons et matériels conformément aux réglementations locales et fédérales vous concernant.
- La solution d'arrêt Reagent EIA contient < 1% m/v d'acide sulfurique. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.
- Le substrat TMB Reagent EIA contient du 3,3,5,5-tétraméthylbenzidine < 0,05% w/w. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.

PROCEDURE DE TEST

Lire attentivement le mode d'emploi avant de commencer les tests. Contacter le fabricant ou votre fournisseur en cas de questions supplémentaires concernant le produit. Effectuer les tests entre +15 et 25°C. Conserver le kit au réfrigérateur (entre +4 et 8 °C) pendant les périodes d'incubation.

1. Ouvrir le kit et vérifier qu'il contienne tous les composants figurant sur l'étiquette du couvercle.
2. Diluer les échantillons à 1:201 avec le tampon de dilution (c-à-d 5 μ l d'échantillon + 1000 μ l de tampon de dilution).
3. Diluer le tampon de concentré de lavage à 1:10 avec de l'eau désionisée (c-à-d 50 ml de tampon de concentré de lavage + 450 ml d'eau). Bien mélanger.
4. Dissoudre le contrôle positif et le contrôle négatif avec 1,3 ml de tampon de dilution et bien mélanger.
5. Prendre le nombre requis de bâtonnets diagnostiques EIA de leur emballage en aluminium et les placer sur le cadre EIA. Si tous les bâtonnets ne sont pas utilisés, refermer immédiatement l'emballage en aluminium et conserver les bâtonnets restants entre +4 et +8°C.
6. Laver les microcupules EIA une fois avec le tampon de lavage (250 μ l / microcupule). Vider les microcupules et les humidifier avec du papier mouchoir.
7. Transférer en double les dilutions d'échantillons, de contrôles positifs et négatifs sur la plaque (100 μ l / microcupule).
8. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
9. Diluer le conjugué HRP à 1:10 avec le tampon de dilution (pour un bâtonnet diagnostique : 100 μ l de conjugué HRP + 900 μ l de tampon de dilution) et bien mélanger.
10. Laver quatre fois les cupules avec le tampon de lavage (250 μ l / microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
11. Transférer le conjugué de RP dilué avec la pipette sur la plaque (100 μ l / microcupule).
12. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
13. Laver cinq fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 μ l / microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
14. Ajouter le substrat de TMB (rose) à la plaque (100 μ l / cupule).
15. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
16. Ajouter la solution d'arrêt (100 μ l / microcupule) et bien mélanger jusqu'à ce que la couleur change complètement (~15 secondes, 600-800 rpm; soit avec un agitateur orbital soit avec le lecteur EIA).
17. Mesurer les résultats dans les 10 minutes avec le lecteur EIA à 450 nm.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer les résultats comme suit : $R = (\text{Échantillon}_A / \text{Contrôle positif}_A) \times K$

R= résultat

Échantillon $_A$ = Absorbance médiane de l'échantillon

Contrôle positif $_A$ = Absorbance médiane du contrôle positif

K = valeur fonction du lot qui figure dans la fiche de données de contrôle comprise dans le kit. Utilisez cette valeur pour calculer les résultats finaux.

Le résultat final est obtenu comme suit :
NÉGATIF : $R < 0,8$
ZONE GRISE : $0,8 \leq R \leq 1,0$
POSITIF : $R > 1,0$

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un résultat **négatif** signifie que l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgM spécifiques du virus Puumala. Cela indique que le patient ne présente pas une infection aiguë au virus Puumala. Dans l'éventualité où une infection aiguë au virus Puumala serait toujours soupçonnée, il faudra répéter l'analyse avec un nouvel échantillon prélevé quelques jours après le premier.

Un échantillon qui s'avère **positif** indique que le patient présente une infection aiguë par le virus Puumala. Un facteur de résistance ou d'autres infections virales n'entraînent pas un résultat positif de cette épreuve. 99 % des patients présentant une infection aiguë au virus Puumala présentent des anticorps IgM du virus Puumala peu de temps après la survenue des premiers symptômes typiques. Une immunité ancienne au virus Puumala n'entraîne pas un résultat positif.

Un résultat situé dans la **zone grise** signifie que le patient pourrait présenter une infection aiguë et nécessite que de nouveaux tests soient effectués. Dans ce cas, suivre les consignes de votre organisation. Il faudra généralement faire un nouveau prélèvement après quelques jours et retester celui-ci. Si le résultat se trouve toujours dans la zone grise ou s'avère négatif, le patient ne présente pas d'infection aiguë au virus de Puumala.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Vérifier que l'absorbance médiane du contrôle négatif et positif réponde aux critères figurant sur la fiche de données de contrôle. Veuillez noter que les valeurs des contrôles positifs et négatifs peuvent varier de lot à lot.

La variation d'absorbance de chaque paire d'échantillon et de contrôle doit être inférieure à 10%. Si le contrôle positif est utilisé dans différentes positions sur la plaque, la variation d'absorbance doit être inférieure à 20 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité et spécificité :

L'accord entre Reagentia PUUMALA IgM EIA et l'EIA interne du département de virologie de l'Université d'Helsinki, Finlande était de 98 % lorsque 100 échantillons sériques de patients positifs et négatifs étaient analysés. Les échantillons étaient confirmés comme étant soit positifs soit négatifs en utilisant la méthode IFA.

Imprécision :

Intra épreuve		
Sérum positif	Absorbance médiane de 0,320	5,4 CV%, n=10
Sérum négatif	Absorbance médiane de 0,098	2,4 CV%, n=10
Inter épreuve		
Sérum positif	Absorbance médiane de 0,318	4,9 CV%, n=5
Sérum négatif	Absorbance médiane de 0,101	3,2 CV%, n=5

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMPOSANTS DU KIT

Composant	Code	Information	Consignes d'utilisation	Conservation & stabilité
Bâtonnets diagnostiques	114201t	Plaque de microtitration recouverte d'un revêtement d'IgM anti-humaines (spécifiques de la chaîne μ).	Lavez les bâtonnets avec le tampon de lavage juste avant utilisation.	Non ouvert, dans l'emballage en aluminium entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon pour dilution	114x01v5	Tampon tris. Précoloré (rose). 65 ml.	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, positif	114201v1	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, négatif	114x01v7	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon de lavage concentré	114x01v6	Tampon tris. 2 x 50 ml	Diluer à 1:10 avec de l'eau désionisée juste avant utilisation.	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Conjugué HRP	114201v2	Protéine de la nucléocapside du virus Puumala conjuguée à la peroxidase de raifort. 1,5 ml.	Diluer à 1:10 avec le tampon de dilution juste avant utilisation.	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Substrat TMB	114x01v3	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine. Précoloré (rose). 12 ml.	Prêt à l'emploi	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Solution d'arrêt	114x01v4	0,1 M d'acide sulfurique. 12 ml.	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.

LITTÉRATURE

Hujakka H, Koistinen V, Eerikainen P, Kuronen I, Laatikainen A, Kauppinen J, Vaheri A, Vapalahti O, Narvanen A. Comparison of a new immunochromatographic rapid test with a commercial EIA for the detection of Puumala virus specific IgM antibodies. *J Clin Virol.* 2001 Dec; 23(1-2):79-85.

Hujakka H, Koistinen V, Eerikainen P, Kuronen I, Mononen I, Parviainen M, Lundkvist A, Vaheri A, Narvanen A, Vapalahti O. New immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. *J Clin Microbiol.* 2001 Jun; 39(6):2146-50.

Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Lundkvist Å, Vaheri A. Evaluation of Puumala virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early nephropatia epidemica diagnosis. *Clin Diagn Virol.* 1998 May 1;10(1):83-90